Aus der Poliklinik und Klinik für
Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER ENTMINERALISATIONSMETHODEN FÜR HISTOLOGISCHE ZWECKE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON KOMPLEX-BILDNERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Yüksel Olçay
Istanbul-Türkei

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 46, Tel.: 76 52 61, App. 668

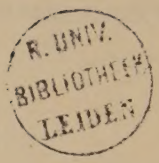
Aus der Poliklinik und Klinik für
Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER ENTMINERALISATIONSMETHODEN FÜR HISTOLOGISCHE ZWECKE UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON KOMPLEX-BILDNERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Yüksel Olçay
Istanbul-Türkei

Dekan: Professor Dr. med. Helmut Selbach
Referent: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt
Korreferent: Professor Dr. med. Hermann Mathis



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 29. September 1961

Meinen lieben Pflegeeltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	7
Material und Methode	8 - 18
Vorbehandlung	8
Fixation	8 - 9
I. Säureentmineralisation	9 - 15
a) Ohne Voreinbettung	9
b) Mit Celloidin-Voreinbettung	9 - 10
c) Entmineralisation unter Druck	10 - 12
d_1) Elektrolytische Entmineralisation ohne Voreinbettung	12 - 15
d_2) Elektrolytische Entmineralisation mit Voreinbettung	15
II. Entmineralisation mit dem Komplexbildner (Chelation)	15 - 18
Nachbehandlung	18
Ergebnisse	19 - 27
A. Entmineralisationsdauer	19 - 23
B. Strukturerhaltung	23 - 27
C. Färbungsergebnisse	27
Diskussion	27 - 32
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	35 - 38

Einleitung

Die Herstellung histologischer Schnittpräparate von Hartgeweben macht eine vorherige Entmineralisation erforderlich. Bis heute sind zahlreiche Entmineralisationsmethoden für histologische und histochemische Zwecke entwickelt worden. Es handelt sich dabei im wesentlichen um eine Säureentmineralisation. Da die Hartgewebe jedoch auch organische Bestandteile enthalten, muß bei jeder Entmineralisation gefordert werden, daß diese organischen Gewebeanteile in ihrer Struktur nicht verändert werden.

Auf dem Gebiet der Zahn- und Kieferheilkunde ergeben sich besondere Schwierigkeiten, da der Zahn in Bezug auf seine Mineralisation kein einheitliches Hartgewebe darstellt und außerdem im Inneren die Pulpa als reines Weichgewebe enthält. Schmelz, Dentin und Zement haben einen unterschiedlichen Mineralanteil, werden also unterschiedliche Entmineralisation zeigen. Dabei unterliegt das im Inneren des Zahnes eingeschlossene Weichgewebe der Pulpa der ständigen Säureeinwirkung.

Bei den allgemein üblichen Entmineralisationsmethoden mit verschiedenen Säuren läßt sich eine Gewebeschonung nur bei einer niedrigen Säurekonzentration erreichen. Hierdurch ist eine lange Entmineralisationszeit bedingt. Dabei ergeben sich bei der Zahnentmineralisation besondere Schwierigkeiten, da bei langer Entmineralisationsdauer der nur geringe organische Anteil der Schmelzsubstanz während der wesentlich länger dauernden Dentinentmineralisation (auf Grund des mengenmäßig hohen Dentinanteiles) verloren geht.

Die Verwendung des organischen Komplexbildners Ethylenediaminnetetraacetic Acid (EDTA) verspricht eine schonendere Entmineralisation der harten Gewebe bei alkalischem p_H im Gegensatz zu den bisherigen Methoden der Säureentmineralisation.

Auf Anregung des Herrn Professor Dr.Dr. E. Harndt habe ich mir die Aufgabe gestellt, folgende Entmineralisationsmethoden miteinander zu vergleichen und die Vor- und Nachteile jedes einzelnen Verfahrens in Bezug auf Entmineralisationsdauer und Strukturerhaltung insbesondere des Schmelzes festzustellen:

I. Entmineralisation mit Säuren:
   a) ohne Voreinbettung
   b) mit Celloidin-Voreinbettung
   c) Entmineralisation unter Druck
   d) Elektrolytische Methode
      1. ohne Voreinbettung
      2. mit Celloidin-Voreinbettung.

II. Entmineralisation mit Komplexbindner:
   a) ohne Voreinbettung
   b) mit Celloidin-Voreinbettung
   c) Entmineralisation unter Druck.

Material und Methode

Als Material für die Untersuchungen wurden frisch extrahierte, möglichst caries- und füllungsfreie, pulpenvitale Zähne verwendet. Ferner stand ein vollbezahnter Unterkieferknochen eines verunglückten zwölfjährigen Jungen zur Verfügung. Da die Zähne bei einem Individuum den gleichen Mineralisationsgrad aufweisen, lassen sich bei Anwendung unterschiedlicher Methoden durch den Seitenvergleich die sichersten Aussagen über Vorzüge bzw. Nachteile der Behandlungsart machen.

Vorbehandlung

Die Zähne wurden nach der Extraktion zunächst unter fließendem Wasser von Zahnstein, Zahnfleisch und Knochenresten gereinigt. Um eine Diffusion der Fixations-, Entmineralisations- und Einbettungsflüssigkeiten in die Pulpa zu ermöglichen, wurden die Zähne mit einem Rosenbohrer in Höhe des Pulpencavums trepaniert.

Fixation

Auch bei Hartgeweben muß - wie es in der Mikrotechnik der Weichgewebe üblich ist - durch eine Fixation die Struktur des Ausgangszustandes festgehalten werden. Hierzu kann man Formalin verwenden. Mardfin und James (17) benutzten neben der Formalinfixierung die Gefriertrocknung für ihre Versuche. Als Material wurde das Cerebellum einer Ratte benutzt. Das getrocknete, gefrorene Material wurde mit dem formalinfixierten Gewebe verglichen. Es zeigte sich, daß Formalin als Fixativ sich nicht mit den Farbmitteln mischt, jedoch die Intensität der Färbung erhöht. Mardfin und James (17) halten es für möglich, daß Formalin die chemische Zusammensetzung der Zelle verändert. Viele Histologen sind der Ansicht, daß die Zelle nach der Gefriertrocknung ein genaueres Bild ergibt als die chemisch mit Formalin fixierte. Die deutlich definierten Strukturen bei chemisch fixierten Zellen sollen durch die Fixation künstlich entstanden sein. Schaffer (28), welcher eine der ausgedehntesten Studien über die Wirkung der verschiedenen Fixative und Säuren auf Hartgewebe gemacht hat, konnte zeigen, daß die Verwendung von 10 %igem Formalin die günstigste Fixation für die Hartgewebe darstellt und dadurch die besten Farbresultate erzielt werden können.

Die weiteren Vorteile des Formalins sind nach Romeis (25) einfache Anwendungsweise, gutes Diffusionsvermögen und geringe Niederschlagsbildung. Von großem Vorzug ist es weiter, daß das Untersuchungsmaterial in Formalin jahrelang ohne Schädigung seiner Färbbarkeit aufbewahrt werden kann.

Auch die Meinungen über die Dauer der Fixation gehen auseinander. Während für die meisten Entmineralisationsmethoden eine Fixationszeit von 7 bis 10 Tagen angegeben wird, benötigt Nelissen (20) eine solche von nur 5 Stunden. Fixationszeiten von einem halben Jahr, wie von Malleson (16) angenommen und später von Frisbie, Nuckolls und Saunders (10) wieder hervorgehoben, erscheinen heute als nicht rationell und unnötig lange.

Das Vorgehen, Hartgewebe ohne Fixation zu entmineralisieren (Abbott 1), wird heute nicht mehr gebilligt, da inzwischen die Bedeutung der Fixation für die Erhaltung der organischen Bestandteile nachgewiesen wurde.

Andresen (2) und später Forshufvud (9) führten Fixation und Entmineralisation gleichzeitig durch, indem 10%iges Formalin der Entmineralisationsflüssigkeit zugegeben wurde. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden die Hartgewebe nach der Vorbehandlung (Reinigung) in 10%igem Formalin 7 bis 15 Tage lang fixiert, ausgenommen diejenigen Präparate, die mit einem Ameisensäure-Formalin-Gemisch entmineralisiert wurden.

I. Säureentmineralisation

a) Ohne Voreinbettung:

Als Entmineralisationsflüssigkeit wurden die schwach konzentrierte Lösung einer starken anorganischen Säure (5%ige Salpetersäure) und eine organische Säure mit Formalinzusatz (85%ige Ameisensäure und 10%iges Formalin zu gleichen Teilen) verwendet. Salpetersäure ist eine der ältesten und heute meistgebrauchten Entmineralisationsflüssigkeiten. Schon 1902 hatten Andresen (2) und Schaffer (28) Salpetersäure zu Entmineralisationszwecken verwendet. Nach Schaffer (28) wirkt diese Säure in 5%iger Lösung sehr schonend, verursacht nur eine minimale Quellung der Proteine und beeinträchtigt kaum die Färbung.

Ameisensäure wird besonders für die Entmineralisation von Zähnen empfohlen (Gröbl 11).

b) Mit Celloidin-Voreinbettung:

Die Versuchsobjekte, die in einem Celloidinblock entmineralisiert wurden, sind vorher auf folgende Weise behandelt worden (Romeis 25):

Durchtränken mit Celloidin je einen Tag mit 2%, 4% und 8%iger Lösung in gut verschlossenen Flaschen.

Die 8%ige Celloidin-Lösung wird unter Luftabschluß auf die Hälfte des Volumens eingedickt und unter Chloroformdämpfen im Exsiccator vorgehärtet. Das Celloidin wird bis auf eine kleine Schicht um das Objekt herum entfernt und der Block je 24 Stunden in absoluten Isopropylalkohol, 95%igen Isopropylalkohol, 80%igen, 70%igen und

60%igen Aethylalkohol gelegt, 24 Stunden lang mit Leitungswasser abgespült und dann entmineralisiert. Die Versuchsobjekte zu a) und b) von möglichst gleicher Art und Größe wurden in den Reagenzgläsern unterhalb der Mitte von 15 ml Flüssigkeitssäule mit Hilfe eines Seidenfadens in Zimmertemperatur aufgehängt. Die Versuche ergaben nämlich, daß die Entmineralisierung von Knochen, die auf dem Boden eines Gefäßes lagen, viel langsamer erfolgte als wenn sie in einiger Entfernung vom Boden aufgehängt waren.

Um die Entmineralisationszeit zu verkürzen, wurde die Hälfte der Flüssigkeit jeden zweiten Tag mit Hilfe einer Wasserspritze vorsichtig herausgezogen und die Reagenzgläser mit frischer Säurelösung nachgefüllt. Durch den Zusatz von frischer Säure wird das Gleichgewicht der chemischen Reaktion gestört; in dem Bestreben, das chemische Gleichgewicht wieder herzustellen, werden vom Hartgewebe neue Anionen frei (Massenwirkungsgesetz).

Genau so kann man die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion durch eine Temperaturerhöhung beschleunigen (Breusch 7); auf diese Weise wird aber die Gasbildung (hauptsächlich CO_2) intensiviert; diese CO_2-Blasen reißen jedoch beim Emporsteigen die empfindlichen, leichten organischen Elemente mit sich und zerstören gerade das Gewebe, das einer besonders schonenden Behandlung bedarf. Daher erscheint eine Erwärmung während der Entmineralisation als nicht zweckmäßig.

c) Entmineralisation unter Druck:

Forshufvud (9) beobachtete bei Zimmertemperatur die Entmineralisation von Schmelzschliffen unter dem Mikroskop, daß das Schmelzoberhäutchen und die anderen Teile des Schmelzes durch die aufsteigenden Gasbläschen verdrängt und zersprengt wurden, sobald der Schmelz mit der Säure in Berührung kommt. Um das organische Schmelzstruma unversehrt zu erhalten, empfiehlt er die Entmineralisation unter Druck durchzuführen. Nach mehreren Versuchen stellte er fest, daß 3 bis 4 At Druck für diesen Zweck am besten geeignet sind. Mit Hilfe einer Lösung von 200 ml Formalin, 100 ml Salpetersäure und 800 ml Leitungswasser werden die Objekte unter diesem Druck in einem besonderen Apparat gleichzeitig fixiert und entmineralisiert. Nach Beendigung der Schmelzentmineralisation (etwas12 Stunden) legt Fordhufvud den Zahn zur Entmineralisation des Dentins ohne Überdruck 1 bis 6 Wochen in 5%ige Salpetersäure. Später wurden verschiedene Druckapparate (Sognnaes (30), Nelissen (20)) für diese Methode hergestellt, aber das Grundprinzip blieb dasselbe.

Auch unser Apparat entspricht dem, wie ihn Forshufvud benutzte (Abb. 1):

Der Apparat besteht aus zwei zylinderförmigen Hüllen. Die äußere Stahlhülle von 11 cm Höhe und 4 cm Durchmesser, deren Wand- und Bodenstärke 1 cm beträgt, wird mit einem 1 cm dicken, schraubbaren Deckel verschlossen. In diesem Deckel sind ein Manometer

und ein Stahlrohr eingelassen. Dieser äußere Stahlmantel und der Deckel werden durch einen Ring aus nicht zu hartem Gummi von etwa 5 mm Stärke und zusätzlich mit Fett abgedichtet. Durch das Stahlrohr kann man in dem Zylinder mit Hilfe von Pressluft einen Druck bis 10 kg/cm^2 erreichen. Nachdem der Schraubverschluß am Ende des Rohres geschlossen wird, kann man den Schlauch, der mit dem Pressluftgerät verbunden ist, entfernen. Vor dem Öffnen des Apparates muß der Verschluß langsam aufgeschraubt werden, um einen allmählichen Druckausgleich zu erzielen. Erst dann läßt sich der Deckel abschrauben. Um die Lage des Entmineralisationsobjektes und den Entmineralisationsvorgang beobachten zu können, ist oberhalb des Bodens ein kleines Fenster aus unzerbrechlichem Glas angebracht.

Ein Glasgefäß von 3,5 cm Durchmesser und 7 cm Höhe bildet den inneren Teil des Apparates. Um den oberen Rand dieses Glasgefäßes wird mit rostfreiem, dünnen Stahldraht ein Ring befestigt; am Durchmesser des Ringes wird ein Stück Draht vom selben Material gespannt und in der Mitte der Achse das Entmineralisationsobjekt mittels eines seidenen Fadens in die Lösung oberhalb des Glasbodens aufgehängt. Nachdem der Deckel fest zugeschraubt ist, wird der Apparat allmählich von 0 bis 4 At unter Druck gesetzt.

Als Entmineralisationsflüssigkeit wurde 5%ige Salpetersäure und die Lösung des Tetra-Natriumsalz der EDTA verwendet.

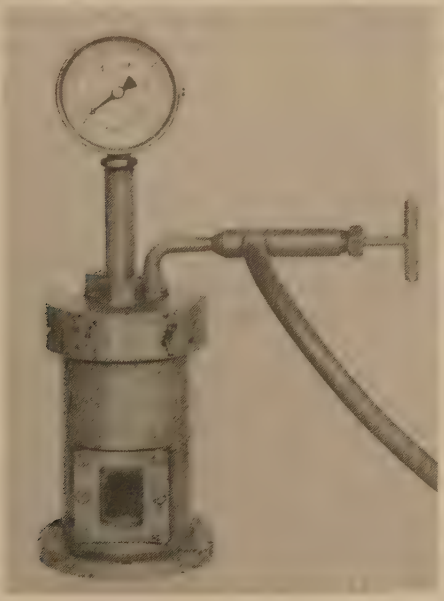


Abb. 1: Der Apparat für die Entmineralisation unter 4 At Druck.
(Beschreibung des Apparates s. S. 10 - 11)

d_1) Elektrolytische Entmineralisation,

die von Richmann (24) in Amerika veröffentlicht wurde, wird sowohl von Kulenkampff (15) als auch von Birkenhauer (5) in den von ihnen entwickelten Apparaten benutzt. Bei Kulenkampffs einfachem Gerät wird der elektrische Strom (500 bis 600 mA) mittels Lichtbogenkohlen in eine Säurelösung geleitet. Das zu entmineralisierende Objekt muß direkten Kontakt mit der Anode haben. Aus diesem Grunde ist die Anode mit einer Haltevorrichtung aus Lichtbogenkohlen versehen, in welche das Entmineralisationsobjekt geklemmt werden muß. Als Säurelösung benutzt Kulenkampff (15) ein Gemisch aus:

176 ml Ameisensäure
40 ml Salzsäure
284 ml Aqua dest.

Die Ameisensäure hat nach Kulenkampff (15) in diesem Gemisch die Aufgabe, das bei der Elektrolyse sich entwickelnde Chlor zu binden, damit es nicht als Gas in Erscheinung treten kann. Birkenhauer (5) baute ein von 100 mA bis 8A regulierbares Gerät, bei welchem er in Glas eingeschmolzenen Platindraht als Elektrode benutzte. Als Entmineralisationsflüssigkeit verwendete er:

10 ml Ameisensäure
8 ml Salzsäure
100 ml Aqua dest.

Das Versuchsobjekt hängt zwischen beiden Elektroden frei in diesem Gemisch. Infolge der Elektrolyse werden an der Anode Platinionen frei und wandern zur Kathode. Da die Anode durch diesen Vorgang in kurzer Zeit aufgebraucht würde, ist ein 24stündiges Umwechseln der Elektroden notwendig. Die Aufgabe der Ameisensäure liegt nach Birkenhauer (5) vielmehr darin, die Lösung schwächer sauer reagieren zu lassen als eine Lösung, in der starkdissoziierende Salzsäure allein vertreten ist. Überdies erhöht die Ameisensäure die potentielle H-Ionen-Konzentration in der Entmineralisierungsflüssigkeit und verhindert dadurch eine schnelle Erschöpfung der Lösung.

Scheliga (29) entwickelte ein Gerät, bei dem sowohl das Grundprinzip der elektrolytischen Entmineralisation als auch das Prinzip der ständigen Bewegung der Entmineralisationsflüssigkeit verwirklicht worden ist.

Unser Apparat (Abb. 2), der nach dem Prinzip von Scheliga (29) gebaut wurde, besteht aus einem Entkalker und einem Vorsatzgerät. Für die Entmineralisation wird ein Gleichstrom benutzt (500 bis 700 mA bei 8 V). Dieser Strom wird durch 2 Halter, die an dem Vorsatzgerät angebracht sind, über die Elektroden in die Entmineralisationsflüssigkeit geleitet. Die Elektroden hängen in einem Abstand von 6 cm in einem Glasgefäß von 15,5 mal 9 mal 9 cm. Szurau (32) benutzte einen Abstand von 20 cm in ihrem elektrolytischen Entmineralisationsapparat. Nach Scheliga (29) kommt es bei einem größeren Abstand von mehr als 6 cm infolge vergrößerten inneren Flüssigkeitswiderstandes zu einer übermäßigen Erwärmung des Elektrolyten

(Joule'sche Wärme). Als Elektrodenmaterial wurde Elektrolytkohle benutzt, welche in der Elektrotechnik bei Elektromotoren und Generatoren verwendet wird. Gewöhnliche Lichtbogenkohle sondert bei langdauernden Entmineralisationsvorgängen durch die mechanische Belastung der an den Elektroden sich ständig entwickelnden und aufsteigenden Gasbläschen in großem Maße Kohleteilchen ab, wird dadurch zerstört, Objekt und Gefäß werden mit einer dicken Schicht von Kohleflocken überzogen. Dies ist auf die ungenügende Härte dieser Lichtbogenkohle zurückzuführen. Bei den teueren Platinelektroden würde die Anode in kurzer Zeit aufgebraucht, wenn man ein 24stündiges Umwechseln der Elektroden nicht durchführte, da infolge der Elektrolyse an der Anode Platinionen frei werden und zur Kathode wandern. Ein Elektrolytkohleblock von 5 mal 4 mal 1 cm wird mit Hilfe einer Gewindebohrung an der Stirnseite an den stromleitenden und gleichzeitig als Befestigung dienenden Gewindebolzen befestigt (Abb. 3a). Durch diese rechteckige Kathode erhält man eine möglichst große nutzbare Fläche für den an der Kathode sich abscheidenden Wasserstoff. Im unteren Teil hat diese Kathode 2 dünne Glasstäbchen als Träger, auf denen eine Glasplatte als Objekttisch liegt.

In eine aufgefeilte Quernut im oberen Drittel der breiten Seite wird eine andere Glasplatte geschoben, welche mit der Kathodenfläche einen Winkel von etwa 135 ^{o} bildet. Durch diese Glasplatte wird in der Flüssigkeit ein innerer Flüssigkeitskreislauf erzeugt. Die bei der Elektrolyse an der Kathode aufsteigenden Wasserstoffblasen dringen nicht mehr senkrecht an die Oberfläche, sie werden mit Hilfe dieser Schrägplatte gezwungen, unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche weiter zu wandern, um einen inneren Flüssigkeitskreislauf zu erzeugen.

Die gesamte Kathodenoberfläche ist mit Ausnahme der Fläche zwischen Objekttisch und ableitender Glasplatte mit einer Isolierschicht von gelbem Klebewachs überzogen. Dadurch wird die Wasserstoffausscheidung auf diese Fläche konzentriert. Eine Isolierung der Anode (Abb. 3b), welche aus einer Elektrolytkohlesäule von 5 cm Höhe und 1 cm Durchmesser besteht, wurde nicht durchgeführt. An der Stirnseite des Vorsatzgerätes sind ein Ampèremeter (0 bis 0,8 A) mit einem Stufenschalter, eine Kontrollampe, eine Sicherung und ein Schalter, welcher den Apparat in Tätigkeit setzt, angebracht. Der Wechselstrom (220 V) wird mit Hilfe eines Transformators und eines Gleichrichters im Apparat in Gleichstrom (8 V) verwandelt.

Als Entmineralisationsflüssigkeit wurde das auch von Kulenkampff (15) benutzte Gemisch verwendet:

176 ml 25%ige Ameisensäure
40 ml 38%ige Salzsäure
284 ml Aqua dest.

Der p_H-Wert dieses Gemisches von 0,5 entspricht etwa dem einer 5%igen Salpetersäurelösung. Die Erschöpfung der Lösung zeigt sich nach langer Entmineralisationszeit durch ein leichtes Absinken der Stromstärke und des Flüssigkeitsspiegels bei gleichgebliebener Spannung und gleichem Elektrodenabstand. Aus diesem Grunde muß das

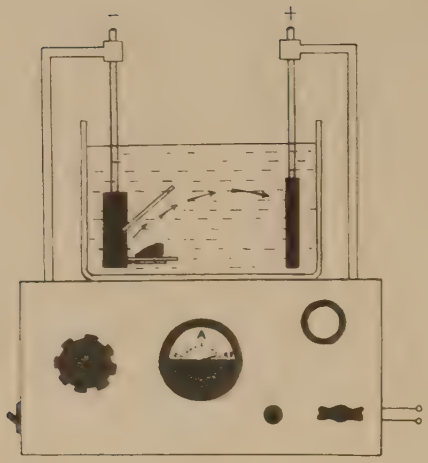


Abb. 2: Schematische Darstellung des elektrolytischen Entmineralisationsapparates (Beschreibung des Apparates s. S. 12 - 13)

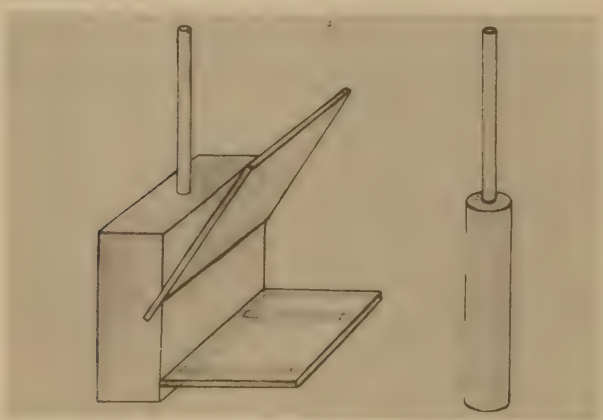


Abb. 3: a) Kathode b) Anode
des elektrolytischen Entmineralisationsapparates
(schematisch)

Gemisch jeden zweiten Tag auf 500 ccm ergänzt werden. Die Entmineralisation geschieht infolge einer chemischen Reaktion zwischen Säure und Mineralsalzionen. Der elektrische Strom dient nur dem schnelleren Abtransport der Ionen, wodurch die Entmineralisation beschleunigt wird. Auch bei der elektrolytischen Entmineralisation auftretende, schon von Birkenhauer (5) erwähnte Flüssigkeitserwärmung (28 bis 35° C) wirkt leicht beschleunigend. Diese Joule'sche Wärme ist auf den dem elektrischen Strom gebotenen Widerstand der Lösung zurückzuführen. Um den stechenden Geruch des an der Anode in starkem Maße abgeschiedenen Chlorgases zu beseitigen, wurde der Apparat in einem Abzug aufgestellt.

Die Zähne und Knochenstücke wurden mittels eines Seidenfadens auf dem Objekttisch befestigt, da sie sonst durch den ständigen Kreislauf in der Entmineralisationsflüssigkeit weggeschwemmt würden.

d_2) Um zu verhindern, daß der entmineralisierte Schmelz während der Dentinentmineralisation durch den Flüssigkeitsstrom weggespült wird, sind auch Versuchsobjekte nach einer Celloidin-Einbettung in kleinen Blöcken entmineralisiert worden.

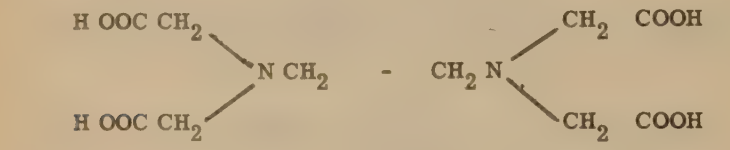
II. Entmineralisation mit dem Komplexbildner (Chelation).

Eine Chelat-Bindung wird auch als Metallbindung bezeichnet, da sie infolge einer chemischen Reaktion als metallorganischer Komplex geschlossener Ringstruktur entsteht (Eggers-Lura 8). Die Metalle werden darin durch koordinierte Kovalenzen an Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel gebunden. Die meisten Chelatoren sind organische Verbindungen, einige davon sind Säuren, während andere basisch reagieren. Der p_H-Wert eines Chelators hat keine Beziehung zu der metallkomplexbildenden Fähigkeit desselben, d.h. eine spezielle chemische Verbindung kann eine starke Säure oder Base und doch ein schwacher Chelator oder umgekehrt sein. Heute sind die Anwendungsgebiete der Komplexbildner vielseitiger (Stüben 31): Viele analytisch-colorimetrischen Teste und Farbreaktionen hängen von der Bildung eines Metall-Chelatkomplexes ab. In der Industrie werden Chelatoren oft verwendet, um Niederschläge anorganischer Salze zu verhindern bzw. aufzulösen. Bei der Behandlung von Bleivergiftungen wird als Komplex ein Calciumdinatriumsalz der EDTA intravenös infundiert (Mellengard-Sörensen 19). Da die Affinität der EDTA zum Blei größer ist als zum Calcium, findet nach Anwendung des Calcium-Komplexes im Organismus ein Austausch von Calcium gegen Blei statt. Aber auch auf anderen Gebieten der Medizin, wie bei der Beseitigung radioaktiver Metalle aus dem Gewebe, oder bei der Behandlung von Hornhauttrübungen, die auf oberflächlichen Kalkablagerungen beruhen, lassen sich Komplexbildner erfolgreich anwenden.

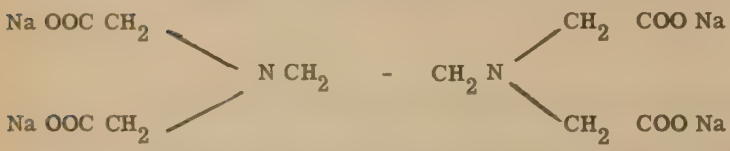
Im Jahre 1951 kam Nikiforuk (22) auf den Gedanken, nachdem in Amerika der Hauptmechanismus der Chelatbildung für die Umwandlung

anorganischer Stoffe bekannt wurde, daß es auch möglich sein müßte, andere mineralhaltige Hartsubstanzen, wie Knochen und Zähne, mit Hilfe von SChelatoren zu entmineralisieren. Die Arbeit, welche er später (1953) zusammen mit Sreebny (23) veröffentlichte, berichten über die entmineralisierende Wirkung der EDTA auf Rattenknochen.

Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und ihre Natriumsalze sind die stärksten Chelatoren, die nicht in der Natur vorkommen. Durch die Substitution des Carboxylgruppen- Wasserstoffs mittels Natronlauge werden die Mono-, Di-, Tri und Tetranatriumsalze gebildet (Nikiforuk 22).

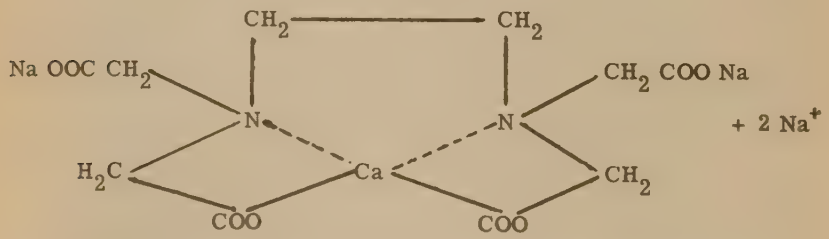


EDTA (freie Säure)



Tetranatriumsalz der EDTA

Kommt ein Chelator, in diesem Falle das Tetranatriumsalz der EDTA mit einem metallischen Kation, hier Ca in Berührung, so ergibt sich folgende chemische Reaktion.



Da das Calciumion wie von Krebsscheren gepackt inmitten des Moleküls sitzt, wie es aus der Konfiguration ersichtlich ist, ist es zu der Namensgebung dieser Bindung als Chelat- oder Krebsscherenbindung gekommen.

Wenn ein neutrales Calciumsalz, wie z.B. Calciumchlorid, einem Dinatriumsalz von EDTA zugefügt wird, so tritt ein beträchtlicher Abfall des p_H-Wertes ein; dies ist eine Folge des Freiwerdens von Wasserstoffionen im Verlauf der Komplexbildung (Nikiforuk 22).

$$Ca^{++} + Na_2H_2EDTA \rightleftharpoons Na_2(Ca\ EDTA) + 2H^+.$$

Diese Erscheinung macht es notwendig, die EDTA-Lösung zu puffern, wenn eine Senkung des p_H-Wertes unerwünscht ist.

Die Entmineralisation von Hartsubstanzen mittels Chelatoren wird von Nikiforuk mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes (M.W.G.) erklärt. Wenn eine schwerlösliche Substanz (wie Knochen und Zähne) in Wasser gelegt wird, so löst sich eine sehr geringe, aber bestimmbare Menge dieser Substanz ab; z.B. bei Schmelz, welcher hauptsächlich aus Calciumphosphat - $Ca_3(PO_4)_2$- besteht, geht eine bestimmbare kleine Menge Calciumphosphat in die Lösung und dissoziiert zu Ca^{++} und PO_4^{---}, bis sich die Zahnsubstanz im Gleichgewicht mit der gesättigten Lösung befindet. Das Produkt der Molarkonzentration von Calcium- und Phosphat-Ionen muß gleich einer Konstanten bei einer bestimmten Temperatur sein. Diese Konstante (K) ist die Löslichkeitskonstante der Zahnsubstanz. Wenn jetzt in diese Lösung EDTA hinzugefügt wird, so werden einige Calciumionen durch koordinative Bindung an den Chelator der Lösung entzogen. Um das Gleichgewicht wieder herstellen zu können, werden von der Hartsubstanz entsprechend der Löslichkeitskonstante neue Calcium- und Phosphat-Ionen in die Lösung gegeben (Nikiforuk 22):

$$\text{Knochen und Zähne} \rightleftharpoons (Ca)^3 \times (PO_4)^2 = K$$

$$\downarrow +\ EDTA$$

$$\downarrow$$

$$Ca\ EDTA.$$

Der Entmineralisationsvorgang wird solange aufrecht erhalten, bis die Chelationsfähigkeit der EDTA erschöpft ist, d.h. bis sämtliche EDTA-Moleküle mit dem metallischen Kationen einen stabilen, wasserlöslichen, nicht dissoziierten Komplex gebildet haben.

Wandelt (34) und Nester (21) prüften die Wirkung von EDTA und die der von ihnen selbst hergestellten Mono-, Di-, Tri- und Tetranatriumsalze dieser Säure auf die Zahn- und Knochensubstanz in verschiedenen Konzentrationen und bei verschiedenen p_H-Werten. Dabei zeigte sich, daß von diesen fünf Substanzen das Tetranatriumsalz der EDTA in einer 1,225 m Lösung, eingestellt auf p_H 7,2 als Chelator die höchste Entmineralisationsfähigkeit besitzt, da durch die größte Löslichkeit dieses Salzes in einer bestimmten Menge Lösung mehr wirksame Moleküle vorhanden sind.

Für die vorliegenden Versuche wurde Tetranatriumsalz der EDTA [+] in einer Lösung von Molarkonzentration (Mol.-Ge von Tetranatriumsalz 380, 2012) benutzt, da die Lösung von 1,255 m sehr dickflüssig ist und während der Entmineralisation durch Flüssigkeitsverlust aus-

---

+ von der Firma Dr. Theodor Schuchardt, München

kristallisiert. Der pH-Wert der Lösung wurde mittels Natriumpyrophosphats auf den Neutralpunkt eingestellt. Die farb- und geruchlose klare Flüssigkeit wurde unter denselben Bedingungen wie bei der Säureentmineralisation (I a, b, c) für die Entmineralisierung von Zähnen und Knochenstücken ohne Voreinbettung, nach Celloidin-Voreinbettung und unter 4 At Druck verwendet.

Sämtliche Versuche wurden bei Zimmertemperatur bis zur völligen Entmineralisation durchgeführt. Das Fehlen der Opazität in Röntgenaufnahmen wurde als Zeichen der totalen Entmineralisation gewertet.

Nachbehandlung

Die Objekte, welche nach einer Celloidin-Voreinbettung entmineralisiert wurden, sind, wie folgt, behandelt worden:
24 Stunden 5%ige Natriumsulfatlösung,
24 Stunden fließendes Wasser,
je 24 Stunden 60%, 70%, 80%iger Alkohol, 95%, 100%iger Isopropylalkohol.

Zur Ausfüllung der entmineralisierten Stellen wird das Objekt in 6%iges Celloidin gelegt und mit Chloroformdämpfen gehärtet. Der Celloidinblock um das Versuchsobjekt, welcher aus 8%igem Celloidin besteht, wird infolge dieser Behandlung in 6%igem Celloidin gelöst, und dabei werden die empfindlichen organischen Bestandteile des Schmelzes, die bisher im Celloidinblock konserviert waren, geschädigt. Aus diesem Grunde wurde die Hälfte der Versuchsblöcke, nachdem sie in 100%igem Isopropylalkohol gewesen waren, in Paraffin eingebettet (Romeis 25). Diejenigen Objekte, die ohne Celloidinvoreinbettung entmineralisiert wurden, sind nach dem Wässern (24 Std.) mit der Alkoholreihe in steigender Konzentration (je 24 Std. 70%, 80%, 94,7% und Alk.abs.) behandelt worden, um das im Gewebe verbliebene Wasser zu entfernen. Anschließend mußten die Versuchsobjekte noch 24 Stunden in Aetheralkohol liegen. Durch die Vorbehandlung mit diesem Gemisch wird die Durchdringung mit Celloidin, welches in Aetheralkohol gelöst wird, erleichtet. Darauf erfolgt die Celloidineinbettung.

Die Präparate wurden mit dem Schlittenmikrotom in 7 - 12 µ dicke Schnitte zerlegt, in 70%igem Alkohol aufgefangen und unaufgezogen gefärbt.

Neben der Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung (mit saurem Hämalaun nach Meyer) kommen noch drei verschiedene Bindegewebsfärbemethoden zur Anwendung:
Van-Gieson-Färbung,
Azan-Färbung,
Silberimprägnationsmethode nach Gomori.

Nach der Entwässerung der gefärbten Schnitte durch Alkohol wurden sie in Caedax eingedeckt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Entmineralisationsvorgänge wurden nach der Entmineralisationsdauer und der Strukturerhaltung beurteilt. Bei allen Ergebnissen, besonders bei der Entmineralisationsdauer spielen folgende Faktoren eine entscheidende Rolle:

1. Welcher Zahngruppe der Zahn angehört, ob es sich um Incisivi, Canini, Praemolaren oder Molaren handelt und insofern auch, welche Größe das Objekt besitzt (Haumann 12).
2. Der individuell unterschiedliche Mineralisationsgrad und das Alter der Zähne (Meyer 18).
3. Die Kristallstruktur der anorganischen Substanzen. Ein Zahn kann beispielsweise einen relativ hohen Gehalt an Mineralien aufweisen, deren Kristallgefüge jedoch nicht so dicht zu sein braucht (Meyer 18).

Um diese individuellen Unterschiede auszuschalten und somit eine bessere Vergleichsmöglichkeit für die verschiedenen angewendeten Entmineralisations-Methoden zu besitzen wurde unter anderen ein vollbezahnter Unterkiefer untersucht.

A) Entmineralisationsdauer:

Wie aus den Tabellen I - IV zu ersehen ist, verläuft die völlige Entmineralisation der Zähne bei der elektrolytischen Methode am schnellsten, hingegen braucht man für die Entmineralisation mit den Chelatoren die größte Zeitspanne.

Auch auf den Röntgenaufnahmen (Abb. 4 und 5) zweier Zähne desselben Patienten kann man völlige und unvollkommene Entmineralisation der mit Säure und Tetranatriumsalz der EDTA behandelten Zähne deutlich unterscheiden.

Von beiden Immobilisationsmaßnahmen hat die Celloidineinbettung eine hemmende, die Druckanwendung eine fördernde Wirkung auf die Entmineralisationsdauer. Der Celloidin-Wall verlangsamt zunächst das Eindringen der Entmineralisationsflüssigkeit, dagegen wirkt der Überdruck einmal als Katalysator bei dem chemischen Vorgang der Entmineralisation, andererseits hat er eine bessere Diffusion der Entmineralisationsflüssigkeit in die Hartgewebe zur Folge, wodurch die Herauslösung der mineralischen Bestandteile aus der Grundsubstanz schneller vonstatten geht.

Ein großer zeitlicher Unterschied zwischen Salpetersäure und Ameisensäure-Entmineralisation konnte nicht festgestellt werden.

Entmineralisationszeiten von Zähnen 40 bis 60 jähriger Patienten.

Säureentmineralisation

Entmineralisations-Methoden		Säureentmineralisation			Elektrolytische Methode	
		Ohne Voreinbettung	Mit	Unter 4 At	Ohne Voreinbettung	Mit
Entm-Dauer (Tage)	1 - 2 wurzelig	22-30	30-40	20-25	1-2	2
	3 wurzelig	25-35	32-42	22-37	2-3	2-4

Tabelle I

Entmineralisation mit Chelatoren

Entmineralisations-Methoden		Tetra-Na-Salz der EDTA		
		Ohne Voreinbettung	Mit	Unter 4 At
Entm. Dauer (Tage)	1 - 2 wurzelig	40-55	52-60	30-40
	3 wurzelig	55-65	62-70	30-45

Tabelle II

Entmineralisationszeiten von Zähnen eines Zwölfjährigen (Unterkiefer)

Säureentmineralisation

Entmineralisations-Methoden		Säureentmineralisation			Elektrolytische Methode	
		Ohne Voreinbettung	Mit Voreinbettung	Unter 4 At	Ohne Voreinbettung	Mit Voreinbettung
Entm. Dauer (Tage)	Incis. Can. Praemol.	20-25	30-35	20	1-2	2
	Mol.	25-30	35-40	25	2	2-3

Tabelle III

Entmineralisation mit Chelatoren

Entmineralisations-Methoden		Tetra-Na-Salz der EDTA		
		Ohne Voreinbettung	Mit Voreinbettung	Unter 4 At
Entm. Dauer (Tage)	Incis. Can. Praemol.	40-50	45-60	25-30
	Mol.	50-60	65-70	30-40

Tabelle IV

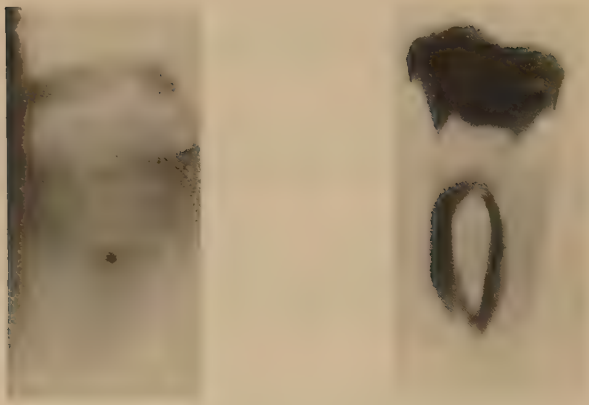


Abb. 4

a b

Entmineralisation von Molaren desselben Patienten im Celloidin-Block nach 39 Tagen a) mit Säure vollkommen,
b) mit Tetranatriumsalz der EDTA unvollkommen.

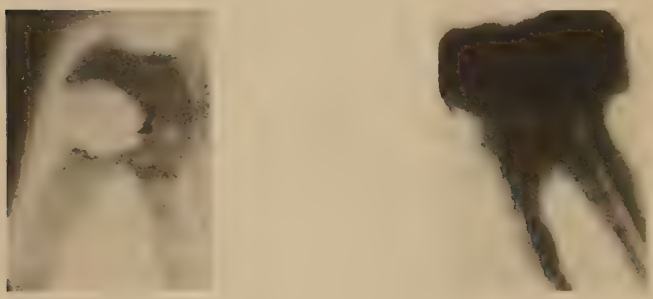


Abb. 5

a b

Entmineralisation von Molaren derselben Patientin ohne Voreinbettung nach 28 Tagen a) mit Säure vollkommen,
b) mit Tetranatriumsalz der EDTA unvollkommen

Für die Entmineralisation der Knochengewebe wurde bei allen Methoden etwa halb soviel Zeit wie für die Entmineralisation der Zähne benötigt.

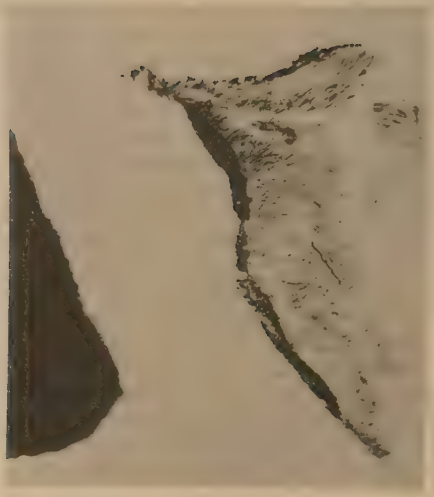
B) Strukturerhaltung

Bei der Entmineralisation der Zähne ist es ohne Zweifel am schwierigsten, die organische Materie des Schmelzes zu erhalten. Die Härte verdankt der Schmelz seinem hohen Gehalt an anorganischen Salzen (96 - 98%) und seinem geringen Gehalt an organischer Grundsubstanz (2 - 4%) (Meyer 18). Die Schmelzprismen sind die Hauptträger der anorganischen Mineralien, dagegen enthält die interprismatische Substanz den größten Teil der anorganischen Baustoffe. Infolge der Entmineralisation verschwinden die etwa 4 µ dicken Prismen sehr schnell ohne Hinterlassung nachweisbarer organischer Rückstände. Die übrig gebliebene etwa 1 µ dicke interprismatische Substanz kann trotz größter Vorsicht sehr leicht verloren gehen, wenn man keine besonderen Immobilisationsmaßnahmen trifft. In den Schnitten der Zähne, welche mit Säuren und Chelatoren ohne Immobilisationsmaßnahmen entmineralisiert worden sind, kann man nur in den Fissuren, wo der Schmelz ziemlich geschützt ist, die Spuren der interpirsmatischen Substanz finden. Auch bei der elektrolytischen Methode wird trotz der Celloidin-Voreinbettung die organische Masse des Schmelzes durch den Flüssigkeitsstrom vom Dentin getrennt. Aus Abb. 6 kann man deutlich ersehen, daß sich ein Stück entmineralisierter Schmelz vom Dentin abgelöst hat und im Celloidin-Wall hängen geblieben ist.

In den Schnitten der Zähne, welche in einem Celloidinblock entmineralisiert worden sind, ist die interprismatische Substanz besser erhalten geblieben. Besonders bei den Zähnen, deren Entmineralisation mit Chelatoren erfolgte, zeigt sich die organische Substanz des Schmelzes als wellenförmig verlaufende Büschel, die eine Länge bis 616 µ erreichen (Abb. 7 und 8). In denselben Schnitten kann man außerdem an der Schmelz-Dentin-Grenze die sogenannte Membrana limitans und sogar die Fortsätze der Thomes'schen Fasern des Dentins im Schmelz deutlich erkennen.

Dagegen zeigt sich bei derselben Vergrößerung und bei derselben Färbung die organische Substanz des Schmelzes, der mit Säure in einem Celloidinblock entmineralisiert worden ist, viel spärlicher (Abb. 9). An einigen Stellen ist die interprismatische Substanz völlig zerstört oder zeigt einen ungeordneten Charakter. Die Membrana limitans verläuft mit mehreren Unterbrechungen. Fortsätze von Thomes'schen Fasern im Schmelz sind nicht erkennbar. Auch die Schnitte der unter 4 At mit EDTA entmineralisierten Zähne zeigen etwa dasselbe Bild (Abb. 10) wie die der Zähne, welche im Celloidinblock mit Säure entmineralisiert wurden. Nur die Membrana limitans ist von der Säure weniger angegriffen. Ein Unterschied zwischen den histologischen Präparaten der mit Säure und mit Chelator unter Druck entmineralisierten Zähne war hinsichtlich der Erhaltung der interprismatischen Substanz nicht feststellbar.

C



IPS

D

Abb. 6

Entmineralisation eines Molaren durch elektrolytische Methode. Die interprismatische Substanz (IPS) des entmineralisierten Schmelzes wurde durch den Flüssigkeitsstrom vom Dentin (D) getrennt und hängt im Celloidinwall (C).
Vergr. 110 : 1
Färbung: Silberimprägnation
Celloidin + Paraffin-Einbettung.

Abb. 7
Interprismatische Substanz des Schmelzes eines mit Tetranatriumsalz der EDTA im Celloidinblock entmineralisierten Praemolaren.
Vergr. 110 : 1
Färbung: Silberimprägnation.
Celloidin + Paraffineinbettung.

Abb. 8
Derselbe Schnitt der Abb. 7
Vergr. 440 : 1

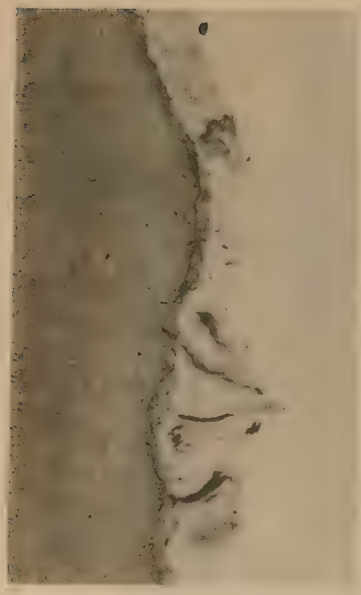


Abb. 9
Entmineralisation eines Molaren mit Ameisensäure im Celloidin-Block.
Vergr. 110 : 1
Färbung: Silberimprägnation,
Celloidin + Paraffin-Einbettung.

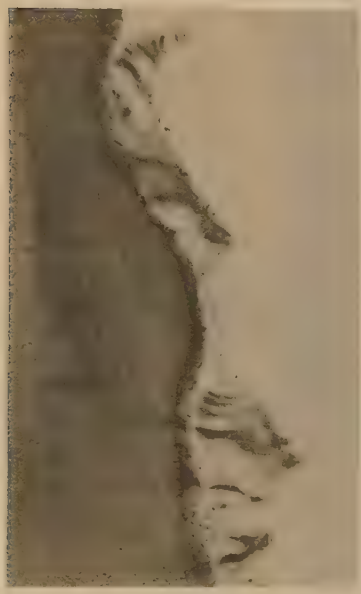


Abb. 10
Entmineralisation eines Molaren mit Tetranatriumsalz von EDTA unter 4 At Druck.
Vergr. 110 : 1
Färbung: Silberimprägnation
Celloidin-Einbettung.

Infolge höheren organischen Gehaltes des Dentins (etwa 30%) macht seine Entmineralisation nicht so große Schwierigkeiten wie beim Schmelz. Durch die Entmineralisation werden die anorganischen Bestandteile aus der amorphen Kittsubstanz herausgelöst. Dadurch wird der etwa 3-4 μ dicke, von der Pulpakammer bis zur Dentinschmelzgrenze ziehende Inhalt der Dentinkanäle deutlicher sichtbar. Das unverkalkte Praedentin wird von den Entmineralisationsflüssigkeiten nur wenig angegriffen (Szurau 32).

Die Wirkung von Säuren und Chelatoren auf das Pulpengewebe ist gleichschonend bis auf die Odontoplastenschicht. Wie aus den Schnitten der Kronen- und Wurzelpulpen der mit Säure entmineralisierten Zähne zu ersehen ist, (Abb. 11a und b) ist der Odontoblastensaum durch große Zwischenräume unterbrochen. Dadurch reißt das Pulpengewebe von der Praedentinzone an vielen Stellen ab. Da diese Unterbrechungen der Kontinuität der Odontoblastenschicht bei allen Präparaten der mit Säure entmineralisierten Zähne zu finden waren, ist ein Artefakt auszuschließen.

Unterschiede hinsichtlich der Erhaltung von Zement- und Knochenstrukturen nach Säure- und Chelator-Entmineralisation waren nicht festzustellen.

C. Färbungsergebnisse

Die Resultate der Färbungen bei den Zähnen, die mit Säure oder Chelator entmineralisiert worden sind, waren allgemein zufriedenstellend. Nur die Pulpenschnitte der mit Chelator entmineralisierten Zähne erscheinen etwas heller, obgleich sämtliche Schnitte die gleiche Stärke haben und unter gleichen Bedingungen gefärbt wurden (Abb. 11 - 12). Dadurch sind die Pulpazellen besser zu erkennen. Die Odontoblastenzone hebt sich scharf ab und steht zur Praedentinzone und den übrigen Pulpaanteilen in gutem Kontrast. Die Gefäßverästelungen und die Gefäßwände sind durch starke Kontrastierung besser sichtbar.

Die Schnitte der mit Ameisensäure entmineralisierten Zähne zeigen farblich bessere Resultate als diejenigen der mit Salpetersäure entmineralisierten, da die Zähne während der Entmineralisation mit Salpetersäure eine leicht gelbe Farbe annehmen, welche später jede Färbung negativ beeinflußt.

Die Silberimprägnation weist bei der Säure- wie auch bei der Chelatorentmineralisation keinerlei Unterschiede auf. In beiden Fällen wurden durch diese Färbung gute Resultate erzielt (Abb. 9 - 10).

Diskussion

Bei allen Säureentmineralisationsmethoden haben die Säuren die Aufgabe, die ursprünglich wasserunlöslichen Salze der Knochen und Zähne in wasserlösliche umzusetzen und dadurch eine Herauslösung der mineralischen Bestandteile aus den Objekten zu bewirken. Bei den älte-

Abb. 11 a
Kronenpulpa eines Eckzahnes nach der Entmineralisation mit Salpetersäure,
Vergr.•155 : 1
Färbung: Azan,
Celloidin-Einbettung.

Abb. 11 b
Kronenpulpa eines unteren Eckzahnes desselben Patienten nach der Entmineralisation mit Tetranatriumsalz der EDTA,
Vergr. 155 : 1,
Färbung: Azan,
Celloidin-Einbettung.

Abb. 12 a
Wurzelpulpa eines Eckzahnes nach der Entmineralisation mit Salpetersäure.
Vergr. 155 : 1
Färbung: Van Gieson, Celloidin-Einbettung.

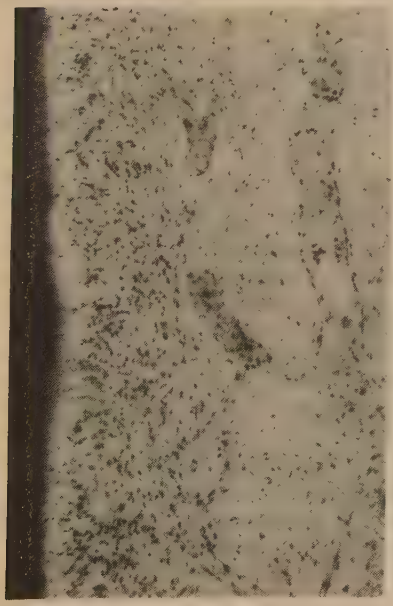


Abb. 12 b
Wurzelpulpa eines Eckzahnes desselben Patienten nach der Entmineralisation mit Tetranatriumsalz der EDTA
Vergr. 155 : 1
Färbung: Van Gieson, Celloidin-Einbettung.

sten Methoden 1872 Waldeyer (33), Wedl (35) wurde Salzsäure als Entmineralisationsflüssigkeit verwendet. Da viele organische Bestandteile des Hartgewebes trotz niedriger Konzentration (2%) dieser Säure verloren gingen, wurden später schwächere Säuren benutzt.

1879/1880 entmineralisierte Abbott (1) seine Schnitte mit 0,5%iger Chromsäure,
1886 Weld (36) mit 6%iger Essigsäure.
1897 brachte Rousseau (26) die Celloidin-Voreinbettung des Untersuchungsmaterials (kalkhaltige Schwämme) mit nachfolgender Entmineralisation in kohlensäurehaltigen Alkohol. Durch diese Voreinbettung wurde eine Immobilisation der empfindlichen organischen Elemente erreicht. 1905/1906 und 1908/1909 gelang es zuerst Bödecker (6) mit dieser Methode Schmelzstücke unter Erhaltung der organischen Bestandteile mit rauchender Salpetersäure zu entmineralisieren. In den folgenden Jahren gab es keine wesentlichen Neuerungen. Die Methoden von Baumgartner (1911) (4), Rygge (1916) (27), Jenkins (1921) (13), Malleson (1924/25) (16), Kato (1928) (14), Arnim (1935) (3) führten zu unterschiedlichen, nicht befriedigenden Ergebnissen. Erst 1944 hat Forshufvud (9) die Immobilisation der organischen Elemente mit Druck eingeführt. Der Druck verhindert das Aufsteigen der bei dem Entmineralisierungsprozeß sich bildenden, mikroskopisch kleinen Gasbläschen, welche in Form von Mikroexplosionen die organischen Bestandteile des Schmelzes zerstören.

1948 führte Sognnaes (30) die Entmineralisation unter 3 bis 4 At Druck bei niedriger Temperatur durch (1° C).

Alle Immobilisationsmaßnahmen verlängern jedoch die Entmineralisationszeit, so verlangsamt das Hinzufügen eines starren Celloidin-Walles um die Zahnoberfläche das Eindrigen der Säure. Auch Forshufvud (9) gab für den Entmineralisierungsvorgang bei einem Druck von 4 At eine sechsfache Zeit als bei atmosphärischem Druck an. Erst 1947 Richmann (24),
brachte mit der elektrolytischen Entmineralisationsmethode den erstrebten Zeitgewinn. Die Entmineralisationsdauer konnte auf ein Zehntel der bisher üblichen Versuchszeit verkürzt werden.

1951 erkannte Nikiforuk (22) die Möglichkeit, die Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA) für die histologische Entmineralisation nutzbar zu machen. Da die EDTA einen hohen Wirkungsgrad auch im Nichtsäurenmilieu besitzt, lag es nahe, die Hartgewebe mit ihrem grazilen organischen Grundgerüst besonders schonend zu entmineralisieren.

1953 entmineralisierten Nikiforuk und Sreebny (23) Tibia, Fibia und Mandibula von 120 Tage alten Ratten mit EDTA bei verschiedenen pH-Werten. Sie stellten fest, daß das Wirkungsoptimum der EDTA zur Entmineralisation in der Nähe des Neutralpunktes liegt. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Behandlung der Hartsubstanzen mit Säuren, zeigte diese Entmineralisation einen schonenderen Verlauf. Die Proteine werden nur gering zerstört, und die CO_2-Bildung ist stark herabgesetzt.

Die Angaben dieser Autoren betreffen das Knochengewebe, dessen organischer Anteil etwa 28% beträgt. Der menschliche Zahnschmelz dagegen enthält etwa 2 - 4% organische Bestandteile. Wenn nun auch Chelatoren sehr schonend wirken, so geht doch ein gewisser Prozentsatz organischer Bestandteile durch mechanische Einflüsse, wie das Wechseln der Entmineralisationsflüssigkeit, Wässern, Entwässern mit Alkohol und bei der Einbettung mit verschieden prozentigen Celloidin, auch bei sorgfältiger Arbeit verloren. Diese Verluste sind bei dem relativ großen organischen Anteil des Knochens ohne wesentliche Bedeutung, bei der Schmelzentmineralisation jedoch bedeuten diese Verluste gleichsam das Verschwinden der gesamten organischen Struktur.

Für die vorliegende Arbeit war die Erhaltung der organischen Schmelzmatrix eine conditio sine qua non. Es war daher naheliegend, die Vorteile der Celloidin-Voreinbettung nach Bödecker (6) mit den erwiesenen Vorteilen der Chelatoren zu einer neuen Entmineralisationsmethode zu kombinieren. Zum Vergleich wurde dann ebenfalls nach der Voreinbettung die Entmineralisation mit Säuren durchgeführt. Werden nun die Ergebnisse der unter gleichen Bedingungen vorbehandelten, jedoch nach verschiedenen Methoden entmineralisierten Zähne gegenübergestellt, so ergibt sich, daß der Hauptträger der organischen Bestandteile des Schmelzes, die interprismatische Substanz, bei der Chelator-Entmineralisation wesentlich besser erhalten bleibt als bei der Behandlung mit Säuren (Abb. 13).

Die Verwendung von 4 At Druck als Immobilisationsmaßnahme nach Forshufvud (9) zur Erhaltung der organischen Bestandteile des Schmelzes erwies sich als nachteilig, da das Öffnen und Schließen des Druckapparates zum Wechseln der Entmineralisationsflüssigkeit und die der Entmineralisation folgende Nachbehandlung den am Anfang erzielten Erfolg auch bei größter Vorsicht zunichte machte. Sowohl bei der Säure- als auch bei der Chelator-Entmineralisation zerreißen die noch bei geschlossenem Druckapparat vorhandenen zusammenhängenden organischen Gewebe, sobald der Druckausgleich herbeigeführt wird. Da dieser Vorgang bei dem notwendigen Wechseln der Entmineralisationsflüssigkeit mehrmals erfolgt, führt diese mechanische Beanspruchung schließlich zur Zerstörung des Gewebes. Das Gleiche gilt für die Nachbehandlung der ungeschützten Objekte. Was die Entmineralisationsdauer bei dieser Methode betrifft, so wurde im Gegensatz zu Forshufvud (9) für die Entmineralisation eine kürzere Zeit benötigt, als bei atmosphärischem Druck, da der Überdruck einmal als Katalysator bei dem chemischen Vorgang der Entmineralisation, andererseits durch bessere Diffusionswirkung der Entmineralisationsflüssigkeit in die Hartgewebe beschleunigend wirkt.

Fast alle Autoren sind sich darüber einig, daß die Verwendung der Chelatoren im Gegensatz zu Säuren eine größere Zeitspanne erfordert. Nikiforuk und Sreebny (23) geben hierfür das Verhältnis 7 : 1 an.

Haumann (12) 1958, benötigte für die vollständige Entmineralisation eines Zahnes 17 bis 20 Tage, Stüben (31) 1959, 15 bis 20 Tage. Aus

diesen Arbeiten ist jedoch nicht ersichtlich, ob es sich bei diesen Zeitangaben um Incisivi, Canini, Praemolaren oder Molaren handelt. Nach den vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit jedoch besteht ein zeitlicher Unterschied bei der Entmineralisation von Incisivi und Molaren von etwa 5 bis 10 Tagen, festgestellt an dem Untersuchungsmaterial des Unterkiefers (Tab. III und IV). Wie aus den Tabellen I bis IV ersichtlich, wurde für die Chelator-Entmineralisation etwa die doppelte Zeit benötigt wie bei Säure-Entmineralisation.

Ist für bestimmte Diagnosen eine besonders schnelle Entmineralisation erforderlich, so ist die elektrolytische Methode vorzuziehen.

Allerdings wirkt sich - trotz der Celloidin-Voreinbettung - hier die Flüssigkeitsbewegung nachteilig auf empfindliche organische Teile des Schmelzes aus. Daher sollte diese Methode für die Aussagen über die Schmelzstruktur nicht verwendet werden.

Bei Knochenstücken oder Zähnen, deren Schmelzstruktur für die mikroskopische Untersuchung nicht maßgebend ist, läßt sich die einfache und billige Säure-Entmineralisations-Methode ohne besondere Schutzmaßnahmen anwenden und brauchbare Resultate erzielen.

Zusammenfassung

Es wurden etwa 200 Zähne, ein vollbezahnter Unterkieferknochen und verschiedene Knochen- und Schmelzstücke unter gleichen Bedingungen mit Säuren (ohne und mit Voreinbettung, unter 4 At Druck und nach elektrolytischem Verfahren) und mit Komplexbildnern - Tetranatrium-Salz der Aethylendiamintetraessigsäure - (ohne und mit Voreinbettung und unter 4 At Druck) entmineralisiert.

Die histologischen Schnitte wurden nach vier verschiedenen Färbungsmethoden (Hämalaun-Eosin nach Meyer, Van-Gieson, Azan und Silberimprägnation nach Gomori) gefärbt. Es konnte dabei folgendes beobachtet werden:

1. Die Entmineralisation mit dem Komplexbildner benötigt etwa die doppelte Zeit wie die Säureentmineralisation.

2. Die Komplexbildner entmineralisieren die Hartgewebe schonender als die Säuren.

3. Eine Immobilisationsmaßnahme in Form der Celloidin-Voreinbettung ist bei der Schmelzentmineralisation auch für die Komplexbildner unbedingt erforderlich.

4. Elektrolytisches Verfahren und Entmineralisation unter Druck erwiesen sich für die Schmelzentmineralisation als nicht geeignet.

5. Die Farbergebnisse der mit Säuren und Komplexbildnern entmineralisierten Schnitte zeigten keine Unterschiede.

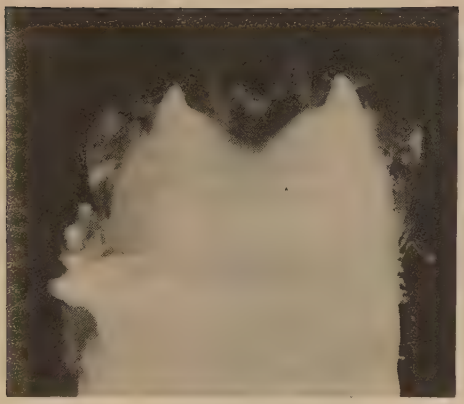


Abb. 13

Die Krone eines im Celloidin-Block mit Tetranatriumsalz der EDTA entmineralisierten Praemolaren nach der Auflösung des Celloidin-Walles. Spinnengewebeartige Hülle der interprismatischen Substanz um die Krone.

Literaturverzeichnis

1. Abbott, F. — Caries of Human Teeth, Dental Cosmos 21 : 57, 113 and 177, 1879

A Contribution to the Study of the Minute Anatomy of Enamel, Dental Cosmos 29 : 254, 1887

The Minute Anatomy of Dentine and Enamel, Dental Cosmos 22, 393, 1880

2. Andresen, V. — Beitrag zur Histologie des Schmelzes, Dentistische Monatsschrift für Zahnheilkunde, Leipzig, 20, 345, 1902

3. Arnim, S.S. — A Method for Preparation of Serial Sections of Teeth and Surrounding Structures of the Rat, Anat. Rec. 62 : 321, 1935

4. Baumgartner, E. — Über das Wesen der Zahnkaries mit besonderer Berücksichtigung der Histologie des gesunden und kariösen Zahnschmelzes, Deutsche Monatsschr. f. Zahnh., Leipzig 29 : 321, 1911

5. Birkenhauer, H. — Über ein Verfahren zur elektrolytischen Schnellentkalkung von Hartgeweben, Zahnärztliche Welt 15 : 1950

6. Bödecker, C.F. — Eine Entkalkungsmethode für Gewebe, welche wenig organische Substanz enthalten, insbesondere Zahnschmelz. Ztschr. f. wissensch. Mikr. 22, 190, 1905

Vorläufige Mitteilung über organische Gebilde im menschlichen Zahnschmelz, Anat. Anz. 34, 310, 1909

7. Breusch, F.L. — Lehrbuch der gesamten Chemie, Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1954

8. Eggers-Lura, H. — Die Metallchelatierung und ihre Bedeutung für die künftige Kariesforschung. D. Z. Z. 11. Jg., H. 10

9. Forshufvud, S. — Eine Entkalkungsmethode für den histologischen Gebrauch, die das Retikulinstruma des Zahnschmelzes schont.
Acta Odent. Scand. 6 : 19, 1944

10. Frisbie, H.E., Nuckolls, J. Saunders, J.B. de C.M. — Distribution of the Organic Matrix of the Enamel in the Human Tooth and Its Relation to the Histopathology of Caries,
J. Am. Coll. Dentists 11 : 243, 1944

11. Gröbl, T. — Histologische Technik 1950, Wien

12. Haumann, N. — Experimentelle Untersuchungen über die Entkalkung von Zahnhartgewebe mit Komplexbildner,
Zahnmed. Diss. 1958, Kiel

13. Jenkins, C.E. — A Decalcifying and Dehydrating Fixative.
J. Path u. Bact. 24 : 166, 1921

14. Kato, S. — The Histological Study of Human Enamel,
Shikwa Shimpo 21 : 1, 1928

15. Kulenkampff, H. — Ein Apparat für elektrolytische Entkalkung von Knochen.
Zbt. allg. Path u. path. Anat.
86, 107 - 109, 1950

16. Malleson, H.C. — The Histology of Enamel Caries.
Brit. D.J. 46 : 907, 1925

A. Preliminary Note on the Structure of Human Enamel as Revealed in Decalcified Sections,
Brit. D.J. 45 : 601, 1924

17. Mardfin, D., James, E.V. — Effect of Nitric Acid and Chelation Demineralization on various Stains of Dental, 36, 759, 1957

18. Meyer, W. — Normale Histologie und Entwicklungsgeschichte der Zähne des Menschen.
Carl Hanser Verlag, München 1951

19. Mellengard, K., Sörensen, G. — Acute lead intoxication treated with EDTA, Journ. Amer. Med. Ass. 158, 436, 1955

20. Nelissen, R. — Brauchbare Schnellverfahren zur Entkalkung von Zähnen und Kieferteilen.
Med. Diss., Bonn, 1954

21. Nester, W. — Über die Möglichkeit der chemischen Aufbereitung von Wurzelkanälen mittels EDTA. Zahnmed. Diss., Berlin 1958

22. Nikiforuk, G. — Demineralization of hard tissues by organic chelating agents. J.D. Res., 30, 472, 1951

23. Nikiforuk, G., Sreebny, L. — Demineralization of hard tissues by organic chelating at neutral pH's, J.D.Res. 32 : 859 - 867, 1953

24. Richmann, I.M., Gelfand, M., Hill, I.M. — A Method of decalcifying bone for histologic section, A. of Bath. Bd. 44, S. 92

25. Romeis, B. — Mikroskopische Technik. Leibniz Verlag, München 1948

26. Rousseau, E. — Eine neue Methode zur Entkalkung und Entkieselung der Schwämme, Ztschr. f. wissensch. Mikr. 14 : 205, 1897

27. Rygge, J. — Über die Schmelzbildung und Schmelzstruktur, Norsk. Tannl. Tid. 26 : 415, 1916

28. Schaffer, J. — Versuche mit Entkalkungsflüssigkeiten. Zeitschr.f.wiss.Mikr., 19 : 308, 328 und 441 - 443, 1902

29. Scheliga, N. — Ein Verfahren zur elektrolytischen Entkalkung von Zähnen. D. Zahn-, Mund- und Kieferheilk. Band 17, 1952

30. Sognnaes, F.R. — The organic elements of the enamel. J.D. Res. 27 : 609 - 622, 1948

31. Stüben, J. — Über die Ca-bindende Affinität verschiedener Komplexbildner, ermittelt an Schmelzproben vor und nach Behandlung mit Fluor-Natrium. D.D.Z. 8 : XII. Jg. 1959

32. Szurau, J. — Über eine neue Schnittmethode für Zahnpräparate nebst einigen Bemerkungen über Entkalkungsartefakte. Med. Diss. Berlin 1955

33. Waldeyer, W. — Structure and Development of the Teeth, in Stricker's Manual of Histology New York, 1872, William Wood and Company, pp. 321 - 341

34. Wandelt, S. Das Chelat-Phänomen als möglicher Faktor in der Caries-Aetiologie, D. Z. Z. 14, H. 17, 1255, 1959

35. Wedl, C. Pathology of the Teeth with Special Reference ot Their Anatomy and Physiology, Philadelphia, 1872, Lindsay and Blakiston, p. 46

36. Weld, G. The Distructive Energy of the Chloride of Iron on the Teeth. An Experimental Study, Dental Cosmos 28 : 627, 1886

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald Harndt, Direktor der Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Freien Universität Berlin für die Überlassung des Themas und sein großes Interesse an der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn Dr. med. dent. Siegfried Wandelt von der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Freien Universität Berlin danke ich für die Förderung meiner Arbeit durch seinen Rat und sein großes Entgegenkommen.

Frau Franziska Cremer, med.-techn. Assistentin vom histologischen Labor der obigen Klinik bin ich ebenfalls für ihre Hilfe zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1. Januar 1934 in Maltepe/Istanbul geboren, besuchte ich das Mädchenlyzeum in Ankara bis zum Abitur im Juni 1951. Anschließend studierte ich an der Universität Ankara vier Semester Medizin. Nach dem zweiten Semester machte ich das Vorphysikum.

Im September 1953 ging ich nach Deutschland, um Zahnmedizin zu studieren. Im April 1954 begann ich mein Studium an der FU Berlin und bestand im März 1959 die zahnärztliche Hauptprüfung.

Seit April 1959 arbeitete ich als Hospitantin in der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund und Kieferkrankheiten der FU und übernahm ab März 1960 Vertretungen und Assistentenstellen bei Zahnärzten.